AMEA-nın Xəbərləri (biologiya və tibb elmləri), cild 73, №3, səh. 53-58 (2018)

Решения экологических проблем с использованием полиеновых макролактонных соединений в комплексе с диметилсульфоксидом

В.Х. Гасимова

Бакинский государственный университет, ул. Академика З.Халилова, 23, Баку AZ1148, Азербайджан; E-mail: vafahal@hotmail.com

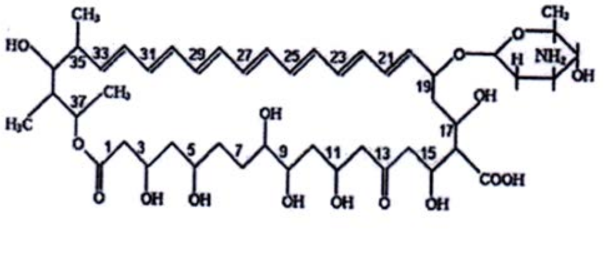
Показано, что при комплексном использовании полиеновых антибиотиков (ПА) с диметилсульфоксидом (ДМСО) резко усиливается биологическая активность антибиотиков. Представлены сравнительные физико-химические характеристики ДМСО и ПА. Рассмотрены эффекты комплексного взаимодействия ДМСО и ПА с бислойными липидными мембранами (БЛМ). Методом БЛМ определены параметры биологической активности ПА. Показано, что из всех изученных ПА самыми эффективными оказались амфотерицин В и леворин. Изложены результаты зависимости проводимости БЛМ от концентрации амфотерицина В и леворина и от концентрации холестерина в мембранах. На основе ПА разработана экологическая модель защиты окружающей среды путем создания эффективных мембраноактивных препаратов против вирусных, бактериальных и грибковых заболеваний животных и растений.

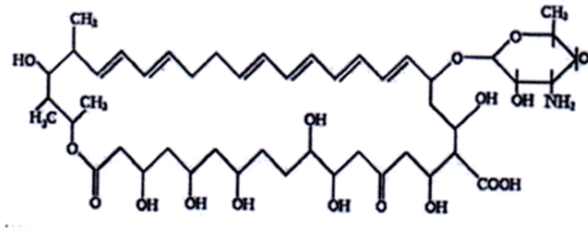
Ключевые слова: *Полиеновые антибиотики, диметилсульфоксид, амфотерицин В, леворин, бислойные липидные мембраны, проводимость мембран, вирусные, бактериальные и грибковые заболевания животных и растений*

ВВЕДЕНИЕ

Защита живых организмов от патогенных инфекций является одной из важнейших и экономически значимых проблем сохранения и продления человеческой жизни. Загрязнение окружающей среды отрицательно влияет на человеческую деятельность и продуктивность растений. Важной задачей является разработка методов защиты человека и животных от патогенных инфекций, а также интегрированной системы защиты растений с использованием безопасных, экологически чистых и экономически эффективных биологических средств. Для разработки эффективно действующих лекарственных соединений против патогенных микроорганизмов необходимо проведение исследований на молекулярном уровне с использованием мембраноактивных антибиотиков. Так, используя биотехнологические методы, из почвенных актиномицетов был получен новый класс полиеновых макролидных антибиотиков (Borowski, 2000). Основными представителями полиеновых антибиотиков (ПА) являются амфотерицин В, нистатин, микогептин, кандицидин D, леворин A_2 и перимицин, химическая структура которых представлена на рис. 1. Молекулы ПА содержат содержат в своем составе лактонное кольцо, сопряженную систему двойных связей и гидрофильную цепь, состоящую и гидроксильных и карбонильных групп. Основная идея и общая концепция данной работы состоит в том, что, исследуя физико-химические свойства ПА и их производных выявить новые вещества, способные избирательно поражать вирусные, стафилококковые и грибковые инфекции (Caffrey et al., 2008). Проведение исследований в данном направлении важно для решения экологических проблем, а именно, для предохранения окружающей среды от патогенных инфекций.

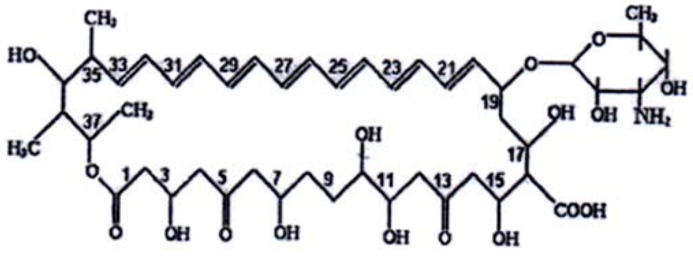
Выбор ПА в качестве объекта исследования был не случаен. Исследования последних лет показали, что ПА обладают высокой биологической активностью и специфичностью своего действия на клеточные мембраны. Особенность ПА состоит в том, что это единственный в природе класс соединений, образующих в клеточных и липидных мембранах структурные ионные каналы. В основе механизма действия ПА лежит формирование ими в клеточных мембранах каналов молекулярных размеров, избирательно проницаемых для ионов и органических соединений (Cohen, 2010). В результате формирования каналов в мембране происходит утечка основных метаболитов, что приводит к лизису клеток. Растущий интерес ученых во всем мире к изучению механизма действия ПА стимулировало с нашей стороны необходимость проведения исследований механизма действия ПА на молекулярном уровне.



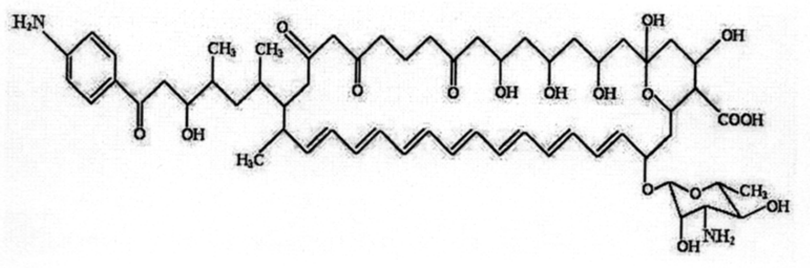


НИСТАТИН

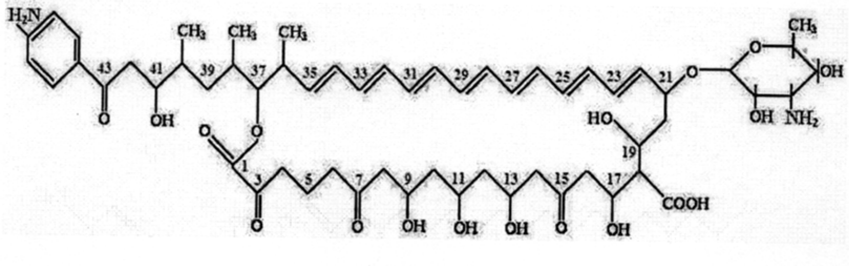
АМФОТЕРИЦИН В



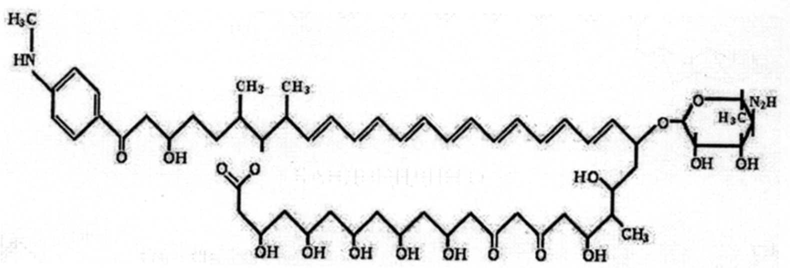
МИКОГЕПТИН



КАНДИЦИДИН D



ЛЕВОРИН A_2



ПЕРИМИЦИН

Рис. 1. Химические формулы основных антибиотиков.

Этому во многом способствовала расшифровка химической структуры ПА и разработка путей модификации полиеновой молекулы (Aszalos et al., 1985). Особая роль в формировании проводящих амфотерициновых и левориновых каналов внутри мембраны принадлежит диметилсульфоксиду (ДМСО) (Yu and Quinn,1994). ДМСО обладает способностью резко усиливать биологическую активность ПА и индуцировать в

мембранах избирательную проницаемость для ионов и органических соединений. Актуальность работы связана с исследованием молекулярного механизма функционирования в липидных мембранах амфотерицина В и леворина A_2, а также их алкильных производных, экспериментальному доказательству существования каналов молекулярных размеров, индуцирующих ионную проницаемость мембран и разработкой теоретических основ синтеза новых соединений с заданными свойствами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ПА хорошо растворяются в ДМСО. Полиены обладают амфотерными свойствами, ионизируясь, они образуют в кислой среде катион, а в щелочной – анион (Ibragimova et al., 2006). В комплексе с ДМСО полиены представляют собой жидкость темно-желтого цвета, горьковатого вкуса, со специфическим запахом. При приготовлении активной формы ПА необходимо сначала преобразовать антибиотическое вещество из порошкообразной формы (кристаллической) в молекулярную форму. При этом достигается перевод антибиотического вещества в наиболее эффективную форму. После тщательного перемешивания ПА с ДМСО состав выдерживается в течение суток при комнатной температуре. Затем жидкость фильтруется и хранится в темном, прохладном месте. В результате получается маточный раствор ПА, готовый к использованию. Применение ПА в таком сочетании компонентов является высокоэффективным.

Биологическая активность ПА определяется методом бислойных липидных мембран (БЛМ) (Samedova et al., 2018). БЛМ получали из общих фосфолипидов, выделенных из клеток, путем нанесения капли фосфолипидов на отверстие в тефлоновой ячейке. Общие фосфолипиды очищали от холестерина и других нейтральных липидов ацетоновой промывкой и хранили при 0^oC при концентрации 20 мг/мл в хлороформ-метанольном растворе в объемном соотношении (2:1). Изучалась интегральная проводимость мембран в зависимости от концентрации антибиотика в режиме фиксации потенциала. При определенной концентрации антибиотика достигается максимальная проводимость мембран, которая берется в качестве активной составляющей ПА. Основные сведения о механизме функционирования ПА в мембранах были получены с помощью метода БЛМ. Метод основан на способности ПА резко повышать проницаемость липидных мембран для соответствующих ионов путем регистрации изменения электрической проводимости мембран. Исследования интегральной проводимости и измерение мембранного потенциала проводилось в режиме фиксации потенциала и тока с помощью электрометрического усилителя постоянного тока Keithley-301 (США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведен скрининг биологической активности антибиотиков с помощью метода регистрации электрических характеристик БЛМ в режиме фиксации потенциала и тока и установлена связь между структурой антибиотиков и их функцией в мембранах. Среди исследованных антибиотиков наибольшей мембранной активностью обладают амфотерицин В и леворин A_2. Было обнаружено, что амфотерицин В вызывают изменение проницаемости липидных и клеточных мембран для ионов и органических соединений. Биологическая активность амфотерицина В зависит от содержания в мембранах стеринов определенной структуры, в комплексе с которыми антибиотики формируют в мембранах ионные каналы, избирательно проницаемые для ионов и органических соединений. Исследования молекулярного механизма взаимодействия амфотерицина В с мембранами показали, что антибиотик в комплексе со стеринами создает в мембранах каналы олигомерной структуры. Канал формируется путем взаимодействия одной молекулы амфотерицина В с одной молекулой холестерина. Аминная группа молекулы антибиотика, входящая в состав микозамина, связывается с карбоксильной группой соседней молекулы и, благодаря образованию водородной связи между двумя полярными группами, может стабилизировать канал в проводящем состоянии. Исследование в данном направлении позволяет создать теоретически обоснованную рекомендацию к синтезу новых антибиотиков с заданными свойствами. Исследованы физико-химические характеристики ДМСО в мембранах, а также сравнительные физико-химические характеристики ДМСО в растворах. На рис. 2. показано схематическое изображение молекулярной структуры ДМСО. Молекула ДМСО амфифильна и высокополярна. Молекулы ДМСО имеют цепочечное строение, обусловленное кислородными связями. Исследования спектров поглощения ДМСО в интервале длин волн 350 нм - 2200 нм показали, что ДМСО в указанном интервале длин волн оптически прозрачен. ДМСО хорошо растворяется в воде. Биологическая активность амфотерицина В и леворина A_2 резко возрастает

при растворении в ДМСО. Антибиотики в растворе ДМСО по сравнению с исходными водорастворимыми формами примерно в 10-100 раз эффективнее. ДМСО присущи такие свойства как амфифильность, полярность, высокая резорбция и способность растворять многие органические соединения до молекулярной формы.

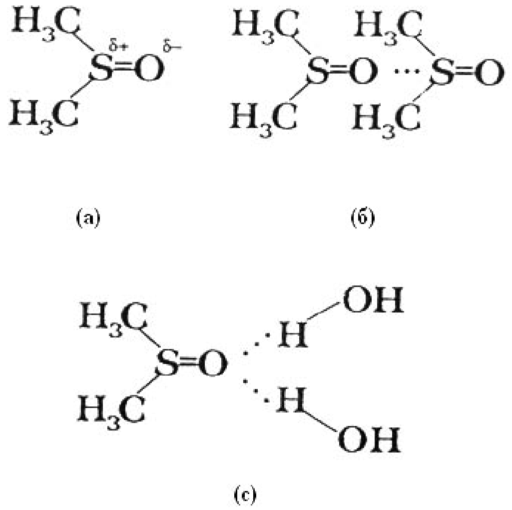


Рис. 2. Схематическое изображение молекулярной структуры ДМСО с полярной S=O связью: (а) – структура ДМСО; (б) - полимерносвязанная форма молекул ДМСО; (с) - водородная связь между молекулами ДМСО и молекулами воды.

Исследована зависимость проводимости бимолекулярных мембран от концентрации амфотерицина В и леворина A_2. Амфотерицин В резко увеличивает проницаемость мембран для ионов, воды, неэлектролитов и органических соединений, когда находятся по обе стороны мембраны. Зависимость проводимости мембран от концентрации амфотерицина В растет пропорционально 8-10-ой степени и эта степень зависит от структуры молекул ПА. При определенных условиях, например при кислых pH=3,0 и при уменьшении концентрации фосфолипидов вдвое в мембраноформирующем растворе амфотерицин В может эффективно увеличивать проводимость с одной стороны мембраны. В этом случае зависимость проводимости мембран оказывается пропорциональной 3-4-ой степени концентрации амфотерицина В. Резкая зависимость проводимости мембран от концентрации амфотерицина В позволила преположить, что ионная проницаемость связана с образованием в мембранах полиеновых каналов олигомерной структуры. Думается, что система, ответственная за избирательную проницаемость мембран, локализована в гидрофильной цепи молекулы амфотерицина В. Было показано, что после формирования в мембранах проводящего олигомерного комплекса полиеновый канал имеет тенденцию к автономной разборке внутри мембраны и перехода его в непроводящее состояние. Собранный проводящий канал может разбираться помономерно или димерно. При увеличении концентрации ДМСО увеличивается эффективность сборки полиеновых каналов и стабилизируется работа канала в проводящем состоянии в течении длительного времени. Модификация аминной или карбоксильной группы молекул амфотерицина В (алкилирование или блокирование зарядов), находящихся у входа в канал, существенно уменьшает среднее время жизни канала в проводящем состоянии. Амфотерицин В при концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ М в 10^5-10^6 раз понижает исходное удельное сопротивление мембран ($1\text{-}5 \cdot 10^{-8}$ Ом·см^2), приготовленных из общих фосфолипидов. Добавка холестерина к фосфолипидам понижает сопротивление мембран, увеличивая эффективность действия антибиотика (Ciesielski et al., 2016). Мембраны в присутствии амфотерицина В избирательно проницаемы для одновалентных анионов. Однако, при исследовании ароматических антибиотиков было обнаружено, что в отличие от амфотерицина В, леворин A_2 вызывает избирательную проницаемость не для анионов, а для катионов щелочных металлов. Этот антибиотик отличается от нистатина, амфотерицина В и микогептина наличием в молекулах дополнительной ароматической группировки–ρ-аминоацетофенона, в которой содержится положительно заряженный азот. Поэтому трудно думать, что избирательная проницаемость для катионов связана с образованием в мембранах, содержащих холестерин, отрицательно заряженных пор. Скорее, перенос катионов через границу мембраны осуществляется с помощью комплекса “ион-антибиотик-холестерин”. По мере увеличения концентрации ДМСО чувствительность мембран к антибиотикам уменьшается, хотя угол наклона зависимости проводимости мембран от концентрации антибиотиков при этом не меняется. Приведенные данные показывают, что постепенное увеличение концентрации ДМСО в водном растворе способствует переходу молекул ПА из дисперсной, т.е. ассоциированной формы в мономолекулярную форму и в этой форме молекулы ПА оказываются биологически неактивными. Отсюда следует, что молекулы ПА, находясь в ассоциированной форме, обладают очень высокой мембранной активностью, а распад проводящего комплекса в мембране означает переход канала из олигомерной структуры в мономерно-димерную и потере им проводимости. Изучение зависимости проводимости мембран от концентра-

ции исходного леворина A_2 и его алкильных производных показало, что с увеличением длины алкильной цепи молекул леворина A_2 мембранная активность антибиотиков возрастает. Алкильная модификация молекулы леворина не приводит к изменению угла наклона кривых, но определяет только время пребывания антибиотика в мембране.

Практическая ценность работы.

Защита овощных культур от патогенных микроорганизмов является основной проблемой сельского хозяйства. Существующие на данный момент защитные средства не способны предотвратить распространение вирусных и грибковых инфекций. В качестве основы для разработки эффективных противовирусных и противогрибковых препаратов использовали ПА. С целью поиска биологически активного препарата для защиты растений от патогенных инфекций изучено действие ароматического антибиотика на растительные инфекции**.** Для определения эффективно действующей концентрации антибиотика была изучена зависимость проводимости мембран от концентрации ароматического антибиотика. Исходя из этих данных, рассчитана минимальная концентрация антибиотика, которая соответствует максимальной его биологической активности.

ВЫВОДЫ

Впервые изучена роль ПА в решение экологических задач. Проведен скрининг биологической активности ПА с помощью метода регистрации электрических характеристик БЛМ в режиме фиксации потенциала. Установлено, что из всех изученных антибиотиков наибольшей биологической эффективностью обладают амфотерицин В и леворин A_2, продуцируемых почвенными микроорганизмами Actinomyces. Впервые изучены физико-химические свойства и биологическая роль ДМСО в комплексе с ПА. Исследована связь между структурой антибиотиков и их функцией в мембранах. Показано, что использование ПА в комплексе с ДМСО в 10-100 раз усиливает биологическую активность антибиотиков. Изучена зависимость проводимости бимолекулярных мембран от концентрации амфотерицина В и леворина A_2, а также проводимость бислойных липидных мембран в зависимости от структуры каналоформирующих соединений, включая алкильные производные амфотерицина В, индивидуальные компоненты леворина А и алкильные производные леворина A_2

ЛИТЕРАТУРА

Aszalos A., Bax A., Burlinson N., Roller P., McNeal C. (2985) Physico-chemical and microbiological comparison of nystatin, amphotericin A and amphotericin B, and structure of amphotericin A. *J. Antibiot. (Tokyo),* **38:** 1699-1713.

Borowski E. (2000) Novel approaches in the rational design of antifungal agents of low toxicity. *Farmaco,* **55:** 206-208.

Caffrey P. Aparicio J.F., Malpartida F., Zotchev S.B. (2008) Biosynthetic engineering of polyene macrolides: towards generation of improved antifungal and antiparasitic agents. *Current Topics in Medicinal Chemistry,* **8:** 639-653.

Ciesielski F., Griffin D.C., Loraine J., Rittig M., Delves-Broughton J., Bonev B.B. (2016) Recognition of membrane sterols by polyene antibiotics amphotericin B and natamycin, A ^{13}C MAS NMR study. *Front. Cell Dev. Biol.,* **4:** 57.

Cohen B.E. (2010) Amphotericin B membrane action: role for two types of ion channels in eliciting cell survival and lethal effects. *J. Membrane Biol.,* **238:** 1–20.

Ibragimova V., Alieva I., Kasumov Kh., Khutorsky V. (2006) Transient permeability induced by alkyl derivatives of amphotericin B in lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta,* **1758:** 29-37.

Samedova A.A., Tagi-zade T.P., Kasumov Kh.M. (2018) Dependence of ion channel properties formed by polyene antibiotics molecules on the lactone ring structure. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry,* **44(3):** 337-345.

Yu Z.W., Quinn P.J. (1994) Dimethyl sulphoxide: a review of its applications in cell biology. *Bioscience Repots,* **14:** 259-281.

Polien makrolankton antibiotiklərin dimetil sülfoksid ilə kompleks birləşmələrdən istifadə etməklə ekoloji problemlərin həll edilməsi yolları

V.X. Qasımova

Bakı Dövlət Universiteti

Poliyen antibiotiklərin (PA) dimetil sülfoksid (DMSO) ilə kompleks istifadəsi ilə antibiotiklərin bioloji fəaliyyəti kəskin şəkildə artir. DMSO və PA-nin müqayisəli fizikokimyəvi xüsusiyyətləri təqdim edilmişdir. DMSO və PA-nin ikiqat lipid membranları (BLM) ilə kompleks qarşılıqlı təsirləri nəzərə alınır. BLM metodu PA-nin bioloji fəaliyyətinin parametrlərini müəyyən etmək üçün istifadə olunur. Bütün tədqiq olunmuş PA-ların, amfoterisin B və levorinin təsirli olduğu göstərildi. BLM-nin amfoterisin B və levorinin konsentrasiyasına və membranlarda xolesterinin konsentrasiyasına bağlılığın nəticələri göstərilmişdir. PA-nin əsasında heyvan və bitkilərin virus, bakterial və göbələk xəstəliklərinə qarşı təsirli membran aktiv maddələrin yaradılması ilə ətraf mühitin mühafizəsinin ekoloji modeli hazırlanmışdır.

Açar sözlər: *polen antibiotikləri, dimetil sulfoksid, amfoterisin b, levorin, ikitərəfli lipid membranları, membran keçiriciliyi, heyvan və bitkilərin viral, bakterial və göbələk xəstəlikləri*

Solutions of environmental problems with the use of polyene macrolactone preparation in combination with dimethyl sulfoxide

V.Kh. Qasimova

Baku State University

Biological activity of antibiotics was shown to increase sharply when polyene antibiotics (PA) were used in combination with dimethyl sulfoxide (DMSO). Comparative physico-chemical characteristics of DMSO and PO were presented. Effects of the interaction of DMSO and PA with the bilayer lipid membranes (BLM) were considered. Parameters of the biological activity of PA were determined using the BLM method. Amphotericin B and levorin appeared to be the most effective among the all studied PA. The dependence between BLM conductivity and concentrations of amphotericin B and levorin as well as concentrations of cholesterol in membranes was established. On the basis of PA, an ecological model of environmental protection was developed by creating effective membrane-active preparations against viral, bacterial and fungal diseases of animals and plants.

Keywords: *Polyene antibiotics, dimethyl sulfoxide, amphotericin B, levorin, bilayer lipid membranes, conductivity of membranes, viral, bacterial and fungal diseases of animals and plants*